

【書類名】 明細書

【特許出願人】

【氏名】 佐久間和夫

【住所】 日本国北海道上川郡下川町上名寄 2119 番地 1

【発明の名称】 抗微生物剤

【発明の技術分野】

本発明は、抗微生物剤に関するものであって、より具体的には、グアヤコール及びリグニン類、並びにそれらの類縁関係にある化学物質を有効成分とし、エイズウイルス、インフルエンザウイルス等のウイルス並びに種々の細菌類に対し抑制効果がある抗微生物剤に関するものである。

【発明の背景】

近年、健康食品に関して、いわゆる食物繊維やポリフェノールなどに高い関心が集まっている。これらは、元来、比較的容易に入手できる材料の中に含まれている化学物質であって、古くからそれとは知らずに摂取されていたものが多い。例えば、チョコレートの中のポリフェノールは、近年喧伝されているが、もともとカカオに含まれていて、表立って騒がれる以前から人々は知らずに口に入れていたものである。ワインの中のポリフェノールも同様であり、コンニャクや牛蒡の中の食物繊維もまた然りである。これらと同様に、比較的身近にあって入手が容易かつ安価であるのに、その化学的又は生物学的活性が知られずに放置されていた、或いはまったく別の用途に向けられていた化学物質がいわば無数にある。それらの中に、もし意外な抗ウイルス性や抗菌性をもつものがあるかもしれないと考え、そのような化学物質を有効に特定できれば、安価で強力な薬効物質を安定的かつ継続的に社会に提供し、人類に福音をもたらすことができると考えたのが本発明に着手した一つのキッカケである。

また、米国では一年間に使用される抗生物質の約 75%が風邪のためと言われる。大部分の風邪はウイルス感染で起きるため、細菌を殺す抗生物質は効果がないとされている。こうした抗生物質による濫用により、薬剤耐性菌が増加している現状にあり、抗生物質の濫用を防止する上でも、本発明に着手した訳である。

一方、近年、エイズやインフルエンザなどのウイルスが蔓延して世界中の人類を苦しめ、これに対し研究者の並々ならぬ研究努力が続いているが、満足できる薬効物質はなかなか開発されていない。細菌類に対しても同様である。特に、合成新薬の類は、強力な効果があるとしても、副作用もまた強く、病原性微生物を抑制するとともに人体をも疲弊させるという望ましくない結果を生じることが多い。合成物質のほかに、いわゆる天然物の中にも、抗ガン性や抗ウイルス性、抗菌性のあるものが知られており、これらを民間療法的に利用することも行なわれているが、これら天然物は、効果が認められても、その量的・質的に安定な継続供給の面で不安があり、広く社会に行きわたらせるには問題がある。

【発明の概要】

そこで本発明は、比較的安定的かつ継続的に供給することができ、副作用が少なく、望ましい抗微生物活性を挙げる多くの化学物質を検証し、その有効性を確定して抗微生物剤とすることを課題としてなされたものである。

この課題解決のため本発明は、最初、広くはベンゼン環をもつ化合物を対象として選び出し、その中からフェノール類に着目し、さらにはヒドロキル基とメトキシ基をもつ化学物質、特にグアヤコール及びリグニン類、並びにその類縁関係にある化学物質に照準を当てて、抗ウイルス活性、抗菌活性を評価し確認したものである。ウイルスとしては、2種のエイズウイルスと3種のインフルエンザウイルスを対象とし、菌類としては、大腸菌O-157、肺炎桿菌、腸炎菌(サルモネラ菌)、綠膿菌、黄色ブドウ球菌、枯草菌を対象とした。本発明の初期試験で取り上げた化学物質は優に100種類を超える多さであったが、中でもリグニン類は非常に多数のものについて試験をした。その過程から、同じ「リグニン」という言葉で括られている物質でも、それぞれに特性があつて決して一様ではなく、例えば効力にしても、エイズには効くがインフルエンザには効かないとか、ウイルスには効くが細菌には効かないとか、或いは逆に、細菌には効いてもエイズには効かないとか、また、同じエイズウイルスについても培養3日目では抑制効果があるがウイルス濃度が上がる6日目には抑制効果がない(6日活性なし)とか実際にさまざまな状況であった(具体的には後記各所で主なものを詳述)。結局、一つひとつの物質について、その性状を調べたり、分子量を測定したり、構成元素を分析したりして、それぞれの物質について個々に個性を見極め、そして個々に効力の評価試験をして、同類の化学物質(例えばリグニン類)でも効くもの・効かないものがあることを明確厳格に選別して本発明に至ったものである。

このような膨大な作業・試験・研究・考察を経て有用性ありと判定されて本発明に開示するものは、以下に詳説する13種(化1~14の化学式に示す)の化学物質(以下、これらを検体1~13という)並びにその関連物質である。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

本発明で分子量測定に用いた試薬の分子量分布を示すグラフである。

##### 【図2】

本発明に開示した抗微生物剤の1つリグニンスルホン酸の分子量分布を示すグラフである。

##### 【図3】

同じく本発明に係るリグノスルホン酸ナトリウム塩の分子量分布を示すグラフである。

##### 【図4】

同じく本発明に係るリグノスルホン酸ナトリウム塩アセテートの分子量分布を示すグラフである。

##### 【図5】

同じく本発明に係るリグニンオルガノソルブプロピオネートの分子量分布を示すグラフである。

##### 【図6】

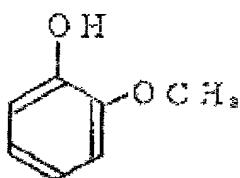
本発明に関連して調べたフミン酸の分子量分布を示すグラフである。

## 【発明の詳細な説明】

検体の説明 本発明に開示する検体は以下の 13 種である。

(1) グアヤコール この物質は、グアヤコールのほか、1-ヒドロキシ-2-メトキシベンゼン、2-メトキシフェノール、0-メトキシフェノール、0-ビドロキシアニソール、2-ヒドロキシアニソール、メチルカテコールなどとも呼ばれていて、この構造は下記の化 1 の式で表わされる。

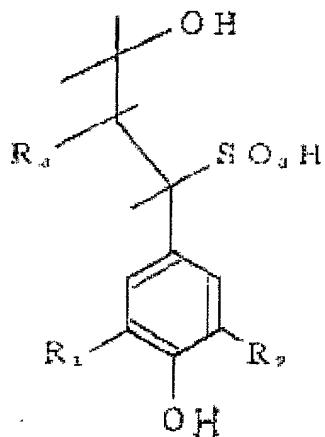
### 【化 1】



このグアヤコールは、従来から工業用資材として大量に生産されているもので、普通は分析試薬や防腐剤などの用途に当てられていた。本発明で使用したグアヤコールは、米国ウィスコンシン州ミルウォーキー市ウェスト・セントポール 1001 のアルドリッヂ・ケミカル・カンパニー・インコーポレイテッドで製造販売している純度 98% のグアヤコールである。その性状は、無色か又はかすかに黄色がかった液体で、沸点 205°C、融点 17~29°C、引火点 82°C、比重 1.129 である。上記のように、この物質の従来の用途から見て、抗ウイルス性、特に抗エイズ活性や抗インフルエンザ活性があるとはとても予想できないところであったが、本発明によりこれらの活性が見出されて確認され、しかも抗菌性も含めた多面的な抗微生物性を有することを見出したのは驚きである。なお、このグアヤコールを選別する際に、類似物として本発明者はグアヤコール-4-スルホン酸カリウム 0.5 水和剤に着目した。これはグアヤコールにカリウムを付けて水に易溶性としたものである。ところが、この類似物で抗ウイルス性試験をしたところ、細胞障害が起こって測定不能となった。類似物といっても、わずかな成分の違いが結果を大きく相違させることになるので、安易な推論は厳に慎まなければならない。また上記した化学合成品のほか、グアヤコールは天然のグアヤック樹 (*Guaiacum sanctum*) から採取することもできる。樹幹を約 1 メートルに切断し縦穴をあけて直火加熱で成分を溶出させるか、小材片 (チップ) を煮沸して抽出する。立木に傷をつけて樹液を浸出させてよい。いずれにしても、グアヤック樹なら採取される「グアヤック脂」は、今日、食品用抗酸化剤として、また酸化剤や酸化酵素の検出用試薬、分析用試薬などとしての用途が知られており、そのために工業的に生産されている製品である。このグアヤック脂は、本発明においてグアヤコールと共に、抗エイズ活性について試験され、同等乃至それ以上の成果を上げた。詳しくは後記試験例（【エイズウイルスの 100% 増殖阻止活性 (1)】のグアヤコール（検体 1）の項を参照）で説明する。

(2) リグニンスルホン酸 この物質の構造は化 2 の式で表わされる。

### 【化 2】

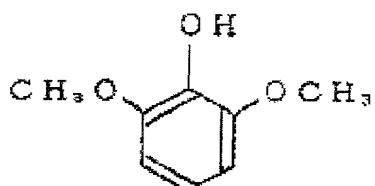


(この式において、R<sub>1</sub>は主としてOCH<sub>3</sub>、R<sub>2</sub>はHか又は他のリグニン単位、R<sub>3</sub>は他のリグニン単位である)

このリグニンスルホン酸は、関東化学（株）（住所：東京都中央区日本橋本町3-2-8）で製造販売している製品で、性状は黒色粉末で薄いバニラの臭いがする。この物質を後記する測定法により分子量分布を測定した結果を図2のグラフに示すが、分子量20,000以上、45,000以下が大部分である。この物質も、本発明により優れた抗ウイルス性（抗エイズ性、抗インフルエンザ性）並びに抗菌性を有することが確認された。本発明者は、いわゆるリグニンの中で最初はリグニンアルカリ（アルドリッヂ社製）に着目して、後述するような方法（3日培養、6日培養）で抗エイズウイルス性の試験をした。リグニンアルカリは、化2（リグニンスルホン酸）の式において、SO<sub>3</sub>Hに代えてH（又は他のリグニン単位）を付け、R<sub>1</sub>とR<sub>2</sub>を入れ替えた形である。これは、リグニンスルホン酸ときわめて近い類縁関係にあるといえるので、普通なら簡単に同等の効力ありと予想されるであろうが、事実はそうではなかつたのである。試験の結果は、全く予想に反して「6日目活性」がなかったのである（6日目活性の意義と重要性については、後述の【エイズウイルスの100%増殖阻止活性】（表2）に関して説明する）。このことからも、「常識」という色眼鏡で見て單なる推測や予想では正しく有効性を判定することはできず、眞実は個々に実際に試験し考察し確認しなければならないことが理解される。

（3）2, 6-ジメトキシフェノール この物質の構造は次の化3の式で表わされる。

【化3】

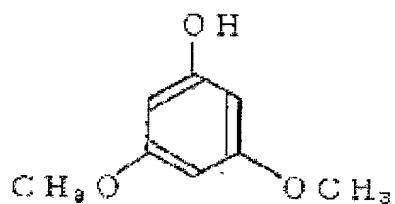


この物質は和光純薬工業（株）（大阪市中央区道修町）販売の液状製品である。性状は茶褐色の液状で、オキシフルのような強い臭いがする。この物質の抗エイズウイルス性、抗菌性は

グアヤコールに匹敵する。

(4) 3, 5-ジメトキシフェノール この物質の構造は次の化4の式で表わされる。

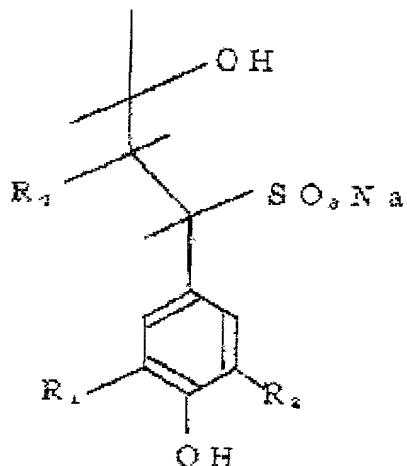
【化4】



この物質は前記した米国アルドリッヂ社製造の製品で、純度 99%，オフホワイト色の結晶性粉末である。沸点 172~175°C，融点 45~47°C，引火点 78°C である。刺激性（眼や皮膚、呼吸器など）がある。この物質は、抗エイズ、抗インフルエンザ、及び抗菌性と幅広く多面的な効力をすることが認められた。

(5) リノグノスルホン酸ナトリウム塩 (Lignosulfonic acid sodium salt) この物質（リグニンスルホン酸ナトリウムともいう）の単位構造は次の化5の式で表わされる。

【化5】



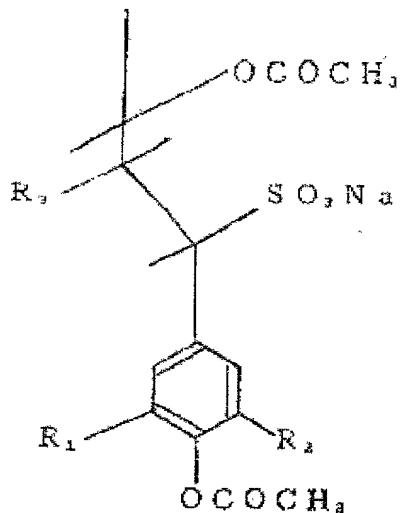
（この式において、R<sub>1</sub>は主としてHか又は他のリグニン単位、R<sub>2</sub>は主としてOCH<sub>3</sub>、R<sub>3</sub>は主として他のリグニン単位である。）

この物質は前記米国のアルドリッヂ社で製造販売している物質である。このリグノスルホン酸ナトリウム塩は、主としてヨーロッパトウヒ (Norway spruce) を原材料としてパルプ工場で単離されるスルホン化リグニン重合体である。単離にはイオン交換（カルシウムからナトリウムへの）とロ過が使用される。リノグノスルホン酸ナトリウム塩の枝分かれした巨大分子構造にはスルホネート基が含まれる（スルホン化度は、フェニルプロパン繰り返し単位当り 0.46 で、硫黄含量 6.7%，ナトリウム含量 5.5% に相当する）。リグノスルホン酸

ナトリウム塩には、第一及び第二脂肪族系 OH と、フェノール系 OH が含まれる。近接するフェニルプロパン繰り返し単位には、C—O—C 並びに C=C 結合を介して結合される。メトキシ含量は、計算で 10. 8% で、元素分析では炭素 46. 17%，水素 4. 70% である。性状は自由流動性（サラサラした）非毒性の粉末で、嵩密度 0. 5 g/cm<sup>3</sup> である。水に可溶。色は茶色。薄い「ジンタン」のような臭いがする。従来、この物質はアニオン系表面活性剤として、またフェノールホルムアルデヒド樹脂への添加物としてもっぱら工業資材として利用されてきたから、本発明が着目したような抗ウイルス性や抗菌性はまったく知られていなかった。しかるに本発明により、きわめて優れた抗エイズウイルス性、抗インフルエンザウイルス性、並びに或る抗菌性とを有することが見出されたことは、驚異である。この物質を後記測定法により測定した分子量分布は図 3 のグラフに示す通りで、分子量 20,000 が大部分であり、分子量 12, 500 及び 3, 800 の分子も存在するごとが認められる。

(6) リグノスルホン酸ナトリウム塩アセテート (Lignosulfonic acid sodium salt acetate)  
この物質の単位構造は次の化 6 の式により表わされる。

【化 6】



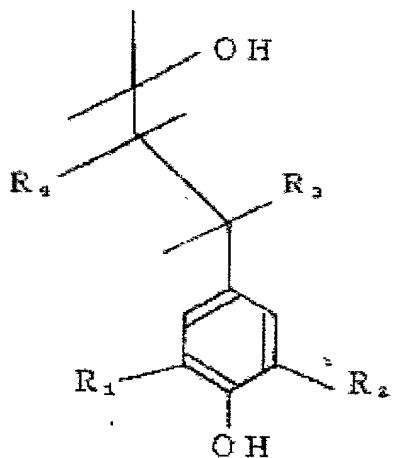
（この式において、R<sub>1</sub>は主として H か又は他の単位であり、R<sub>2</sub>は主として OCH<sub>3</sub>、R<sub>3</sub>は主として他の単位である。）

この物質も前記と同じく米国アルドリッヂ社の製造販売に係るもので、リグノスルホン酸ナトリウム塩の誘導体重合物である。無水酢酸を試薬として、均質相溶液から調製される。脂肪族及び芳香族アセトキシ基を含有する。フェニルプロパン繰り返し単位ごとに 0. 46 のスルホネート基を有する。近接のフェニルプロパン繰り返し単位には C=C 及び C—O—C 結合を介して結合する。元素分析では炭素 47. 16%，水素 4. 72%，窒素 3. 77% で、ICP アッセイで S 5. 4%，Na 3. 1% である。脂肪族系 OH がフェノール系 OH より優勢である。上記同様測定した分子量は図 4 のグラフに示す通りで、分子量 18, 000 と認められる。性状は、サラサラした非毒性の黄褐色粉末で、やや弱いアセテート（酢酸塩）の臭いがする。水

にはどのような pH でも可溶であるが、大部分の有機溶剤には不溶。通常は工業用資材として、化学処理により有機溶剤可溶な誘導体に変性されるヒドロキシルなしの水溶性材料として利用されている。もちろん、抗ウイルス性などの薬効成分としての用途は従来まったく期待されていなかった。しかし、本発明によれば上記(5)リグノスルホン酸ナトリウム塩と同じく、きわめてすぐれた抗エイズウイルス性、抗インフルエンザウイルス性と、或る程度の抗菌性という、多面的な効力を有することが見出された。

(7) リグニンオルガノソルブ (Lignin organosolv) この物質の単位構造は次の化 7 により表わされる。

【化 7】

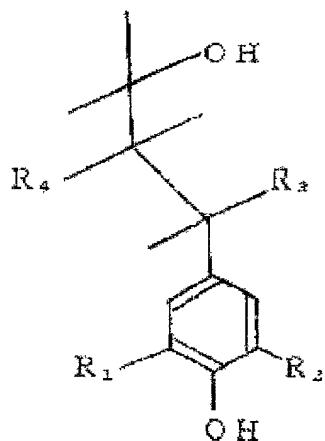


(この式において、R<sub>1</sub>は OH<sub>3</sub>か H か又は他の単位であり、R<sub>2</sub>は主として OCH<sub>3</sub>、R<sub>3</sub>は OH か又は他の単位、R<sub>4</sub>は他の単位である)

この物質も前記同様、米国アルドリッヂ社製造販売の化学物質である。硬質木材の混合物(カエデ 50%、カバ 35%、ポプラ 15%)を原材料として普通のパルプ工場で単離される重合体リグニンである。第一、第二脂肪族系 OH とフェノール系 OH を含み、元素分析は炭素 66. 5%，水素 6. 1%，OCH<sub>3</sub> 18. 9%，蔗糖 0. 5%以下、灰分 1%以下である。性状は、サラサラ流れる非毒性の粉末で、軽いアルコール臭がある。アルカリ水溶液と、特定の有機溶剤に可溶である。従来通常は、フェノールホルムアルデヒド樹脂の添加物として工業的に利用してきたが、その他の用途は未知であった。本発明により一部抗エイズウイルス性が認められた。

(8) リグニンハイドロリティック(Lignin hydrolytic) この物質の単位構造は次の化 8 の式で表わされる。

【化 8】

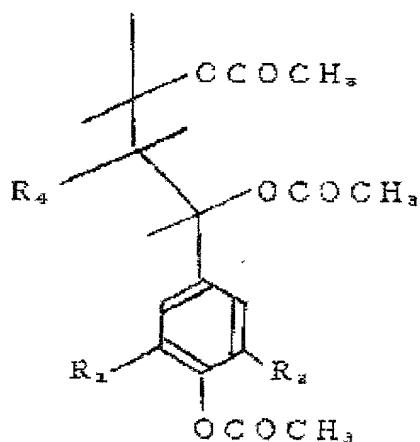


(この式において、R<sub>1</sub>はOCH<sub>3</sub>かHか又は他の単位であり、R<sub>2</sub>はHか又はOCH<sub>3</sub>であり、R<sub>3</sub>は主として他の単位、R<sub>4</sub>は主として他の単位である)

これも米国アルドリッヂ社製造販売の化学物質で、主としてシュガー・ケイン・バッカスを原材料として加水分解工程から単離される自動加水分解性の重合体リグニンである。枝分かれした巨大分子構造には、第一、第二脂肪族系OHとそれより優勢なフェノール系OHが含まれる。メトキシ基含量は9~11%の範囲である。近接のフェニルプロパン繰り返し単位にC=C、C-O-C結合を介して連結する。性状はサラサラ流れる非毒性の褐色粉末で、アルカリ水溶液と、或る種の有機溶剤（例えばメタノール又はエタノール+アセトン、メチレンクロライド、クロロホルム又はベンゼン）に可溶である。通常はフェノールホルムアルデヒド樹脂の添加物として利用されている。本発明により、この物質の抗エイズウイルス性が一部認められた。

(9) リグニンオルガノソルブアセテート(Lignin organosolv acetate) この物質の単位構造は次の化9の式で表わされる。

【化9】



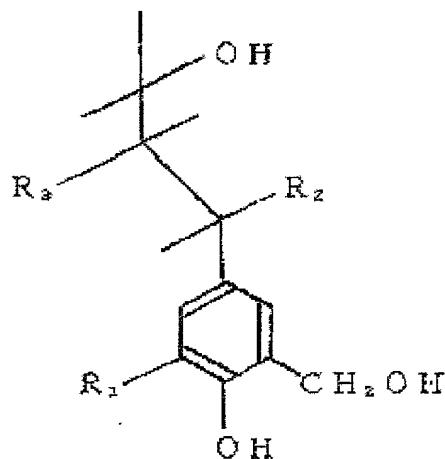
(この式において、R<sub>1</sub>はH、OCH<sub>3</sub>又は他の単位であり、R<sub>2</sub>は主としてOCH<sub>3</sub>、R<sub>3</sub>は主と

して他の単位である)

これも米国アルドリッヂ社製造販売の化学物質で、前記リグニンオルガノソルブから誘導された重合体である。枝分かれした巨大分子構造には第一、第二脂肪族系、及び芳香族系アセトキシ基を含む。少量の CO, COOH 基も含む。性状はサラサラ流れる非毒性の薄茶褐色の粉末で、大部分の有機溶剤には溶けるが、水には不溶。この物質は、他の重合体材料に粘度調整剤、着色剤などとして添加される熱可塑性材料として利用されている。本発明により抗エイズウィルス性が一部認められた。

(10) リグニンハイドロリティックヒドロキシメチル誘導体 (Lignin hydrolytic hydroxymethyl derivative) この物質の単位構造は次の化 10 の式で表わされる。

【化 10】

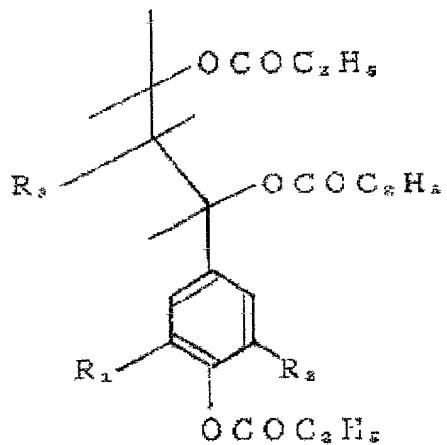


(この式において、R<sub>1</sub>は主として OCH<sub>3</sub>か又は他の単位、R<sub>2</sub> は主として OH か又は他の単位、R<sub>3</sub> は主として他の単位である)

これも前記アルドリッヂ社の製品で、前記(8)のリグニンハイドロリティックの誘導重合体である。リグニンを均質溶液（アルカリ水溶液）中でホルムアルデヒドにより処理することにより調製される。第一、第二脂肪族系、及びフェノール系 OH 基と、少量のカルボキシ官能基を含む。性状はサラサラ流れる非毒性の黒色粉末で、アルカリ水溶液と、特定の有機溶剤に可溶である。この物質は従来フェノールホルムアルデヒド樹脂への添加物として使用されていた。本発明によって、抗エイズウィルス性が一部認められた。

(11) リグニンオルガノソルブプロピオネート (Lignin organosolve propionate) この物質の単位構造は次の化 11 の式で表わされる。

【化 11】

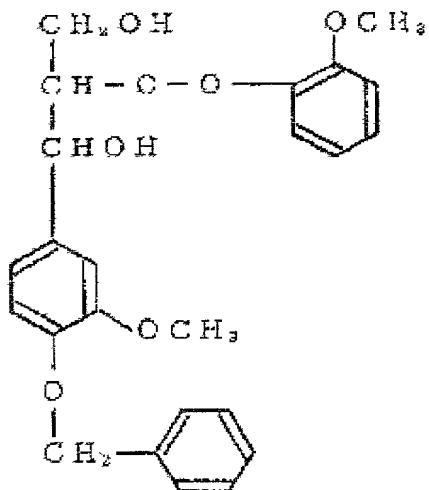


(この式において、 $R_1$ は主としてHか $OCH_3$ か又は他の単位、 $R_2$ は主として $OCH_3$ 、 $R_3$ は主として他の単位である)。

これも米国アルドリッヂ社製造販売の化学物質で、分子量分布は図5のグラフに示す通りである。分子量15,000が中心であり、分子量9,200, 7,500, 1,650が混在している。これは、前記(7)リグニンオルガノソルブの誘導重合体で、無水プロピオン酸を試薬としプロピオン酸ナトリウムを触媒としてプロピオン酸を入れたリグニンの均質相反応により作られる。単離前に、 $H_2O_2$ で一部漂白され、褐色粉末となる。元素分析では炭素57.39%，水素5.58%である。性状はサラサラ流れる非毒性粉末である。従来、重合性材料及びプラスチック類に着色剤、粘度調整剤などの目的で可溶性熱可塑性リグニン誘導体として利用されている。本発明によれば、リグニンオルガノソルブプロピオネートは抗エイズウイルス性と抗菌性において、有用と認められた。

(12) 4-ベンジルオキシグアヤシルグリセロール- $\beta$ -グアヤシルエーテル この物質の構造は次の化12の式で表わされる。

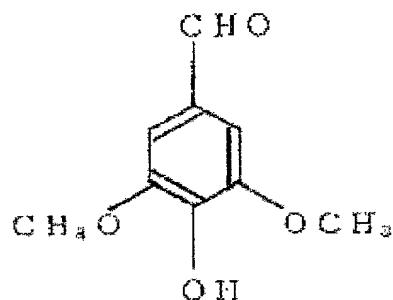
**【化12】**



この物質は、北海道大学より供給を受けた化学物質である。性状は白っぽい粉末である。本発明によれば、この物質は抗エイズウイルス性及び抗インフルエンザウイルス性が一部認められた。この物質に関するSOSについては後述する。

(13) シリンガアルデヒド この物質の構造は次の化13の式で表わされる。

【化13】



この物質も米国アルドリッヂ社製造販売の化学物質である。本発明によれば、シリンガアルデヒドは、かなり強力な抗エイズ性を示すが、細胞障害もまた強いので、適用に際しては他の化学物質との混用などにより障害低減をはかることが望ましい。

#### [分子量測定法の結果]

上記した種々のリグニン類のうち、下記4種と、関連してフミン酸（後記の「リグニンの一般項目分析」（表1）を参照）について実施した分子量測定法について以下説明する。

#### A. 試薬・機器等

##### (1) 供試リグニン

1. リグニンズルホン酸
2. リグニンスルホン酸ナトリウム塩
3. リグニンスルホン酸ナトリウム塩アセテート
4. リグニンオルガノソルブプロピオネート
- (5. フミン酸)

##### (2) 試薬

1. ブルーデキストラン 200 (ファーマシア・ファイン・ケミカルズ社)
2. ポリエチレングリコール 400, 1000, 4000, 6000, 20000 (和光一級)  
(PEGと略称)
3. メタノール (和光特級)  
(試験1. 2. の分子量分布を図1のグラフに示す)

##### (3) 使用機器

1. フラクションコレクター (ADVANTEC SF-2120)

操作条件 シンプルモード

ウェイト時間 0分

分画 85 drop/tube (分子量マーカー)

120 drop/tube (lignin) (共に 2. 5 ml チューブ)

2. 分光光度計 (BECRUN DU 7400)
3. Brix 計 (ATAGO HAND REFRACTOMETER N-1E)

(4) カラム

ゲルロ過剤 トヨパール HW50F (東ソー)  
コック付きカラム ( $\phi 2. 5 \times 120 \text{ cm}$ , ガラス製)

B. 方法

(1) カラムの準備

カラムをスタンドに垂直に固定した。ゲルロ過剤を脱イオン水で洗浄後、自然落下による常法に従ってカラムに充填した。上方に設置した溶媒タンクとカラム上端を連結し、ゲルロ過剤の 3 倍量の脱イオン水で十分洗浄した。カラム下端のコックとフラクションコレクターを連結した。

(2) 分子量マーカーの溶出

分子量マーカー (ブルーデキストラン), PEG の 5 種をそれぞれ約 5~10%となるように脱イオン水に溶解した。ゲルロ過剤の先端までカラム内の脱イオン水を落下させて、下部コックをいったん閉じた後、ゲルロ過剤の表面を乱さないように注意してマーカー溶液 5 ml をカラムに添加した。下部コックを開放して添加液をゲルロ過剤表面まで落し、次いで脱イオン水で溶出を開始した。溶出液はフラクションコレクターで分画した。各フラクションは分光光度計 (ブルーデキストラン, 測定波長 595 nm), Brix 計 (PEG) でマーカーの溶出を検出し、溶出曲線を作成した。最大溶出フラクションを各マーカーの溶出位置として分子量曲線を作成した。

(3) リグニンの溶出

カラムをゲルロ過剤の 2 倍量の 50%メタノール/脱イオン水 (v/v) で洗浄、平衡化した。各リグニン約 20 g を 50 %メタノール水溶液に溶解してカラムに添加した。分子量マーカーと同様の方法で 50%メタノールで溶出し、溶出液を分画した。分光光度計を用いて各フラクションのリグニンの溶出を測定した。測定は各リグニン溶液の最大吸収波長で行った。

リグニン	測定波長 (nm)	
1. リグニンスルホン酸	275	350
2. リグニンスルホン酸ナトリウム塩	275	305
3. リグニンスルホン酸ナトリウム塩アセテート	275	310
4. リグニンオルガノソルブプロピオネート	275	290

各リグニンの溶出曲線を作成して、溶出最大フラクションを求め、先に作成した分子量曲線 (各リグニン 1~4 についてそれぞれ図 2~図 5 のグラフ) から分子量を推定した。

### [3] 結果

#### 1. リグニンスルホン酸

…分子量 20000 以上, 45000 以下が大部分, 分子量 11000 の分子がある.

#### 2. リグニンスルホン酸ナトリウム塩

…分子量 20000 が大部分, 分子量 12500, 3800 の分子も存在する.

#### 3. リグニンスルホン酸ナトリウム塩アセテート

…分子量 18000

#### 4. リグニンオルガノソルブプロピオネート

…分子量 15000 が中心, 分子量 9200, 7500, 1650 が混在する.

#### 5. フミン酸の分子量:

フミン酸については, リグニンの分子量の分析と同様にして, フミン酸の分子量を推定した. ただし, フミン酸 30 mg を 5 ml の 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し, 0.1 N の水酸化ナトリウム水溶液で溶出した.

フラクションコレクター条件: シンプルモード

75drop / Fr. (25 ml)

図 6 のグラフに示したように Fr. No. 117 に溶出のピークがあり, 分子量検量線からフミン酸の分子量を約 3500 と推定した.

#### [一般項目分析]

本発明で使用するリグニン並びに他の天然リグニンと, 関連してフミン酸について, 一般項目の分析をしたので, その内容を以下に記す. 使用した試料は以下の通りである.

#### 試 料

- 1) リグニンスルホン酸 (検体 2)
- 2) リグノスルホン酸ナトリウム塩 (検体 5)
- 3) リグノスルホン酸ナトリウム塩アセテート (検体 6)
- 4) リグニンオルガノソルブプロピオネート (検体 11)
  - A キノコの硫酸リグニン画分
  - B キノコの塩酸リグニン画分
  - C フミン酸

#### A. 方法

各試料 (ただし C は後述) を約 200 mg/ml となるように正確に計り取り, 脱イオン水に溶解した. 十分に攪拌後, 3,000 rpm で 15 分間遠心分離して上澄を分取し, 以下の試験に供した.

使用した機器 分光光度計: 島津分光光度計 UV-1200

pH メーター: 東亜デジタル pH 計-50

#### B. 試験

### (1) 500 nm の OD 及び pH

各試料の 1% (W/V) 水溶液を調製し、500 nm の吸光度及び pH を常法により測定した。

### (2) 蛋白質

Bradford の方法によって各試料水溶液中の蛋白質量を測定した。試料溶液 20 μl を 1.5 ml 容量の試験管にとり、Bradford 溶液 1 ml を混和し、5 分間室温に放置した後、595 nm の吸光度を測定した。対照には Bradford 溶液に脱イオン水 20 μl を加えたものを用いた。試料溶液は適宜希釀して測定し、試料共存物の影響を受けないように留意した。ウシ血清アルブミンを標準試料として作成した検量線から試料溶液中の蛋白質量を算出し、試料 1 g 当たりの蛋白質量に換算した。

### (3) グルコース

グルコース C-II テストワード(和光純薬工業)を用いて試料中のグルコース量を測定した。この測定試薬は酵素法試薬で特異性が高い。試料溶液 20 μl 試験管にとり、発色試薬 3.0 ml を加えて混和した。37°C で 5 分間加温した後、505 nm の吸光度を測定した。対照には各試料溶液に脱イオン水 3.0 ml を加えた溶液を用い、試料溶液の色の影響を除去した。同時にグルコース標準溶液を反応させて検量線を作成した。検量線から試料溶液中のグルコース量を算出し、試料 1g あたりのグルコース量に換算した。

### (4) 全糖類

フェノール硫酸法により試料中の糖の総量を測定した。試料溶液 200 μl を試験管に分取し、5% フェノール溶液 200 μl を加える。ついで濃硫酸 1 ml を滴下し、速やかに攪拌した。室温で 20 分間放置して、490 nm の吸光度を測定した。対照には蒸留水を同様に反応させて用いた。同時にグルコースを標準溶液として反応させて、検量線を作成した。検量線から試料溶液中の全糖をグルコース量として算出し、試料 1 g あたりの量に換算した。以上の各分析試験の結果を次の表 1 に示す。

表 1：リグニン等の一般項目分析

試料	1% 水溶液		蛋白質 (mg/g)	グルコース (mg/g)	全糖 (mg/g)
	500 nm OD	pH			
1 検体2	1. 405 (×10)	8. 87	61. 36	0. 0	357. 1
2 検体5	0. 579	8. 79	19. 19	4. 56	239. 1
3 検体6	0. 347	4. 00	24. 68	0. 27	224. 8
4 検体11	0. 300	4. 86	4. 38	0. 44	0. 399
A 硫酸分画	0. 024	3. 24	(0. 36)	0. 35	0. 323
B 塩酸分画	0. 014	3. 12	(0. 43)	0. 28	0. 318
C フミン酸	0. 030	5. 36	1. 30	0. 18	0. 141

本発明は上記したように 100 種超にのぼる候補物質を取り上げ抗微生物性について鋭意試験研究を行ったが、そこから厳選して有効乃至一部有効と認められたのが、前記した 13 種の化学物質である。実施した試験は、①エイズウイルス増殖の 100% 阻止活性、②インフルエ

ンザウイルス増殖の 100%阻止活性, 並びに後記する③抗菌活性であるが, まず, エイズウイルスの 10%増殖阻止活性について次に説明する.

[エイズウイルスの 100%増殖阻止活性]この試験方法は次の通りである.

各検体(前記した化学物質 100 種超)を水に溶解し, 検体水溶液を作る. 水溶液の初発濃度は  $1\text{mg}/1\text{ml}$  (水溶液  $1\text{ml}$  当り検体粉末  $1\text{mg} = 1000\mu\text{g}$ ) とする. 別にエイズウイルス(HIV-1 と HIV-2 の 2 種)と MT-4 細胞の浮遊液を用意する. 12 個のウエル(穴)を有するマイクロプレートを用い, 検体水溶液は, 1 ウエル目が  $1000\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で, 以下 2 ウエル目から 2 倍段階希釈していく. すなわち 2 ウエルの検体濃度は  $500\mu\text{g}/\text{ml}$ , 3 ウエルは  $250\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4 ウエルは  $125\mu\text{g}/\text{ml}$ , 5 ウエルは  $62.5\mu\text{g}/\text{ml}$  ……と希釈し, 最後に 12 ウエルでは  $0.49\mu\text{g}/\text{ml}$ (2048 倍希釈)となるようにする. 理解を容易にするため, 各ウエルの検体濃度(A) ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 希釈倍数(B) を表にして示す.

ウエル	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.81	3.91	1.95	0.97	0.49
B	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048

マイクロプレートの各ウエルには, 上記各濃度の検体水溶液  $100\mu\text{l}$  ずつとエイズウイルス浮遊液  $100\mu\text{l}$  ずつを注入する. このように検体と共にエイズウイルスを各ウエル内で培養し, 培養 3 日目と 6 日目に全部のウエルを観察して, エイズウイルスの増殖を 100%阻止しているウエルを決定する. 100%増殖阻止とは, ウエル内に共存している MT-4 細胞がエイズウイルスにより破壊されたり変形したりしていないで, 健全である場合をいう. 培養 3 日目はウイルス濃度が 10 TCD で低いが, 6 日目まで培養するとコントロールのウイルス濃度が上がって 100 TCD となる. この上昇する濃度でウイルス増殖を 100%抑制している

「6 日目活性」は, 従って, その検体の有効・無効を評価する重要な基準である. この評価試験から注目すべき結果を挙げたものを選び出し, そのうち検体 1 から 7(前記した化 1~化 7 に相当)までの結果を, 次の表 2 に示す. 表 2において, ○を記入したウエルまでがエイズ増殖を 100%阻止したこと示し(カッコ内の数字はその時の検体濃度  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), それより右の(番号の多い)ウエルではウイルス増殖を 100%は阻止していない. また, \*印をつけたウエルでは, ウイルスによるものではなく検体化合物そのものによる細胞障害が現われたことを示す.

表 2 : エイズウイルスの 100%増殖阻止活性 (1) 検体 1~7 は化 1~7 に相当)

検体	培養	ウエル番号												(略記法)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	3 日			*			○ (31.3)							6T <sub>3</sub>
	6 日			*		○ (125)								4T <sub>3</sub>
2	3 日			*				○ (7.81)						8T <sub>4</sub>
	6 日			*				○ (15.6)						7T <sub>4</sub>

3	3日	*	○ (31.3)	6T <sub>4</sub>
	6日	*	○ (31.3)	6T <sub>5</sub>
4	3日	*	○ (125)	4T <sub>2</sub>
	6日	*	○ (125)	4T <sub>3</sub>
5	3日		○	10T <sub>0</sub>
	6日		○	9T <sub>0</sub>
6	3日		○	9T <sub>0</sub>
	6日		○	10T <sub>0</sub>
7	3日	*	○	7T <sub>5</sub>
	6日	*	<	<6T <sub>5</sub>

検体 1=グアヤコール

検体 2=リグニンスルホン酸

検体 3=2, 6-ジメトキシフェノール

検体 4=3, 5-ジメトキシフェノール

検体 5=リグノスルホン酸ナトリウム塩

検体 6=リグノスルホン酸ナトリウム塩アセテート

検体 7=リグニンオルガノソルブ

こうしてグアヤコール（検体 1）はエイズウイルスの増殖を、3 日培養で 6 ウエル（31. 3  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ）まで、6 日培養（6 日目活性）で 4 ウエル（125  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ）まで 100% 阻止していることが示された。細胞障害は、それぞれ 3 ウエル（250  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ）まで認められた。この結果を表 2 の右側にあるように、6T<sub>3</sub>（3 日目活性）、4T<sub>3</sub>（6 日目活性）と略記する（T は Toxicity の略）。本発明は、グアヤコール（検体 1）のほか、グアヤコールを含んでいるグアヤック脂（天然グアヤック樹からの抽出物）についても、抗エイズ効果の試験をした。結果は、3 日目活性 3. 9  $\mu\text{l} / \text{ml}$ （細胞障害 7. 8  $\mu\text{l} / \text{ml}$ ）（略記法で 9T<sub>8</sub>），6 日目活性 3. 9  $\mu\text{l} / \text{ml}$ （細胞障害 7. 8  $\mu\text{l} / \text{ml}$ ）（9T<sub>8</sub>）という好成績を得た。従って、本発明において、グアヤック脂は少なくとも抗ウイルス性、特に抗エイズウイルス性に関しては、グアヤコールと同等物ということができ、天然物ではあるが、前記のように工業製品として容易に供給を受けることができるものであるから、これもグアヤコールと等しく本発明の対象とする。

検体 2 のリグニンスルホン酸は、3 日培養で 8 ウエル（7. 81  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ），6 日培養で 7 ウエル（15. 6  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ）までそれぞれ 100% 阻止を達成し、細胞障害はそれぞれ 4 ウエルまでであった。3 日目活性 8T<sub>4</sub>，6 日目活性 7T<sub>4</sub> という数値はきわめて優れた抗エイズウイルス剤であることを示している。検体 3 の 2, 6-ジメトキシフェノールの 100% 阻止活性は、3 日目活性が 6T<sub>4</sub> で、6 日目活性が 6T<sub>5</sub> であって、細胞障害が強い。このことは、後記の抗インフルエンザウイルス性においても同様で、ウイルスそのものを抑制する力は弱くはないが、ウイルスを培養している細胞そのものを損傷してしまうため、それより高い効力を発揮できないということである。しかし、6 日目活性 6 ウエルを達成している事実は従来予見されて

いなかつた優れた効果であるから、有用な抗エイズ剤とすることができます。

検体4の3,5-ジメトキシフェノールは、検体3よりは劣るが、それでも6日目活性で4ウエル(125 $\mu$ g/ml)の濃度でエイズウイルスを100%阻止している。なお、6日目活性の4T<sub>5</sub>は、100%阻止効果のすぐ前の3ウエルで細胞障害を生じているが、このような場合、適量(例えば1:1)の3,4-ジメトキシフェノール(化4の式において、3位と4位にメトキシ基がつく)を混入すると、各成分濃度は2分の1になるが、100%阻止効果を低下させることなく、細胞障害を1ウエルまで下げる事が認められた。3,4-ジメトキシフェノールに代えてアルブミンなど他の物質を混用してもよい。このような低減効果は、一般的に他の検体についても有効であり、2剤又は3剤を混用することにより、それぞれのウイルス抑制効果を減殺することなく、細胞障害を低減することができると認められた。なお、直接的に本発明の対象ではないが、前に「リグニンの一般項目分析」(表1)に記載したキノコ由来のリグニン画分について参考的に言及すると、これらリグニン画分にも優れた抗エイズ活性をはじめとし各種抗菌活性のあることが前記同様の試験手続によって確認されていて、その際生じる細胞障害を低減するためにアルブミンを1:1の割合で混用することによってT<sub>5</sub>をT<sub>1</sub>に低減する効果が見出されている(これらリグニン画分の本体は現在本発明者において同定中である)。

表1の検体5すなわちリノグノスルホン酸トリアリウム塩、及び検体6すなわちリグノスルホン酸ナトリウム塩アセテートの100%阻止効果は驚異的である。10T<sub>5</sub>とは、10ウエル(1.95 $\mu$ g/ml)という低濃度でウイルスの増殖を100%阻止し、しかも細胞障害を生じていないということである。9T<sub>5</sub>にしても3.91 $\mu$ g/mlの低濃度での100%阻止であり、障害はゼロである。このことは、これら両物質がきわめて優れた抗エイズ剤であること、また食品や飲料に混合することにより毒性がない抗エイズ食品・飲料たりうることを示唆するものであり、高度な有用性が期待されるところである。これら両物質は、後記する抗インフルエンザウイルス性においてもきわめて高い効力を示し、また抗菌性も相当程度に期待されるところから、1剤(1物質)で抗ウイルス性(エイズとインフルエンザ)と抗菌性という少なくとも3面の効用を発揮する、多面的な抗微生物剤(食品・飲料)として、日常的にも多用される高い多面的有用性をもって迎えられることが強く期待される。

表2の検体7(化7=リグニンオルガノソルブ)の6日培養では、ウエル6では100%阻止できず、6ウエル以下(<)であることを示す。しかし、現実にはウエル5で細胞障害を生じている(<6T<sub>5</sub>)ので、この物質をそのままエイズウイルスの100%増殖阻止に使用することは实际上難しい。しかし、前記したように他剤と併用することにより細胞障害は低減させることができる。

上記以外の検体、すなわち化8から化13までに相当する化学物質については、前記同様マイクロプレートを用いた100%阻止活性の試験結果を、上記の略記法を用いて下記表3に示す。

表3

検体	3日培養	6日培養
8 リグニン ハイドロリティック	<6T <sub>5</sub>	5T <sub>4</sub>
9 リグニン オルガノソルブ アセテート	6T <sub>5</sub>	<6T <sub>5</sub>
10 リグニン ハイドロリティック ヒドロキシメチル誘導体	<6T <sub>5</sub>	3T <sub>2</sub>
11 リグニン オルガノソルブ プロピオネート	6T <sub>5</sub>	5T <sub>4</sub>
12 4-ベンジルオキシグアヤシルグリセロール-β- グアヤシルエーテル	5T <sub>3</sub>	4T <sub>3</sub>
13 シリンガアルデヒド	11T <sub>8</sub>	10T <sub>9</sub>

検体 11 (リグニンオルガノソルブプロピオネート) は、100%阻止のウエルと細胞障害のウエルが隣接しているが、前記した障害低減作用ある他剤との併用又は混用をすることにより、5 ウエル (62.5 μg/ml) での 100%阻止活性 (6 日目活性) を生かし、十分有用な抗エイズウイルス物質とすることが可能である。なおこのリグニンプロピオネートは後記するように抗菌性においても有効であるから多面的な抗微生物剤となりうること、前記検体 5 及び検体 6 と同様である。

検体 12 (4-ベンジルオキシグアヤシルグリセロール-β-グアヤシルエーテル) に関する連して、これと類似のリグニンモデル構造とされているいわゆる SOS(シリンギルグリセロール-β-シリングルエーテル、別名 3, 5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニルグリセリン-β- (2, 6-ジメトキシフェノール) エーテル)について同じ方法で抗エイズウイルス活性の試験をしたところ、3 日目活性は 15.6 μl/ml (細胞障害 31.3 μl/ml) (7T<sub>6</sub>) と出たのであるが、残念なことに 6 日目活性は得られなかった。これに対し、同様にリグニンのモデルとされている 4-ベンジルオキシグアヤシルグリセロール-β-グアヤシルエーテル (検体 12) は 3 日目活性 5T<sub>3</sub>、そして 6 日目活性 125 μl/ml (4T<sub>3</sub>) という成果が出て、立派に抗エイズ活性のあることが認められた。ここからも、リグニン類ならすべて同等の効力があるなどと軽々しく推断することは誤りであることが理解される。

検体 13 のシリンガアルデヒドは、6 日目活性で 10 ウエル (濃度 3.91 μg/ml) の低濃度で 100%増殖阻止を達成している点で際立った抗エイズウイルス性のあることが認められる。シリンガアルデヒドは、後記の抗インフルエンザウイルス性においても効果があり、抗菌性も濃度次第で発揮されることから、多面的な抗微生物剤ということができる。その他の検体 8, 9, 10 については、前記検体 7 (リグニンオルガノソルブ) と同様に、そのままでは抗エイズ剤としての有用性は認めにくい。なお、参考としてグアヤコール-4-スルホン酸カリウム 0.5 水和剤についても同様な細胞レベルの試験をしたが、これは抗エイズウイルス剤としては有用性が認められなかった。

一般に、本発明に係る上記諸化学物質が抗エイズウイルス性を発揮するメカニズムは、本

発明をこれに限定する意図ではないが、種々の実験及び考察を重ねた結果、プロテアーゼ阻害効果、すなわちエイズウイルスの出すプロテアーゼが標的細胞に付着しようとする働きを本発明化学物質が物理的に標的細胞にはつりくなどして有効に阻害しているものと推定される。同様に、本発明化学物質は、後記するインフルエンザウイルスについても同じような阻害効果のメカニズムをもつものと推定される。

#### 【インフルエンザウイルス増殖抑制効果の評価試験】

次に、本発明の化学物質のうち、上記のような抗エイズウイルス活性試験で有用性が認められたもの、すなわちグアヤコール（化1）、リグニンスルホン酸（化2）、2, 6-ジメトキシフェノール（化3）、3, 5-ジメトキシフェノール（化4）、リグニンスルホン酸ナトリウム塩（化5）、リグニンスルホン酸ナトリウム塩アセテート（化6）、リグニンオルガノソルブロピオネート（化11）、4-ベンジルオキシグアヤシルグリセロール- $\beta$ -グルコアヤシルエーテル（化12）及びシリングアルデヒド（化13）についてインフルエンザウイルス増殖抑制効果の評価試験を行なった。

使用したウイルスは、

- 1) インフルエンザウイルスA/北海道/1/96 (H1N1) (以下、H1N1と略す)
- 2) インフルエンザウイルスA/北海道/1/97 (H3N2) (以下、H3N2と略す)
- 3) インフルエンザウイルスB/北海道/1/97 (以下、B型と略す)

の3種である。

#### MDCK細胞維持液の調整

インフルエンザウイルスを接種するためのMDCK細胞を維持するためMDCK細胞維持液を調製する。

##### 維持液の組成

1. 基礎培地：イーグルのMEM 88 ml
2. ペニシリン、ストマイ：各々200単位/ml  
(20,000単位/mlの溶液を100mlに1ml入れる)
3. グルタミン：0.03%添加 (3%溶液を100mlに1ml入れる)
4. グルコース：0.01%添加 (1%溶液を100mlに1ml入れる)
5. ウシアルブミン(フラクションV)：0.2%添加 (10%溶液を100mlに2ml入れる)
6. ビタミン：4%添加 (100倍溶液を100mlに4ml入れる)
7. pHの修正：pHを7.6~7.8に修正する (5%溶液を100mlにほぼ3ml入れる)

上記のMDCK細胞の培養液で、検体物質（化1~6, 11~14）の各々を段階希釈する。各検体の初発濃度（原液）は、10mg/mlとする（液状のもの、グアヤコールは10μl/ml, 2, 6-ジメトキシフェノールは2μl/ml—表4に\*）。試験管多数を用意し、検体原液と、段階希釈した128倍まで（2倍段階希釈のほか、2.6倍希釈、5.3倍希釈、10倍

希釈、100倍希釈あり)の希釈液0.2mlを10TCIDのウイルス液0.2mlと共に、細胞の入った多数試験管内の1mlの培養液中に混和する。判定法は、ウイルスが100TCIDまで増殖した時に(接種後3~4日)検体がウイルス増殖を抑制する希釈濃度を有効量とした。次の表4に各インフルエンザウイルスの増殖を100%阻止した最小濃度(MIC)を示す(カッコ内は前記と同様の略記法で、例えば3.5T<sub>1</sub>とは、試験管No.3(4倍希釈)とNo.4(8倍希釈)との中間で100%阻止が認められたことを示す)。

表4: 最小抑制有効量(MIC)(検体番号は、化1~6、11~13に相当)

検体	インフルエンザウイルス		
	H1N1	H3N2	B
1	3.8 μl / ml (2.5T <sub>1</sub> )	1.9 μl / ml (3.5T <sub>1</sub> )	3.8 μl / ml (2.5T <sub>1</sub> )
2	1.9mg / ml (3.5T <sub>1</sub> )	1.9 mg / ml (3.5T <sub>1</sub> )	2.5 mg (3T <sub>1</sub> )
*3	1.0 μl / ml 以下 (<2T <sub>1</sub> )	左に同じ	左に同じ
4	5.0 mg / ml (2T <sub>1</sub> )	1.9 mg / ml (3.5T <sub>1</sub> )	3.8 mg / ml (2.5T <sub>1</sub> )
5	0.16 mg / ml (7T <sub>0</sub> )	0.10 mg / ml (8T <sub>0</sub> )	0.63 mg / ml (5T <sub>0</sub> )
6	0.16 mg / ml (7T <sub>0</sub> )	0.16 mg / ml (7T <sub>0</sub> )	1mg / ml (4.5 T <sub>0</sub> )
11	2.5 mg / ml (3T <sub>1</sub> )	2.5 mg / ml (3T <sub>1</sub> )	3.8 mg / ml (2.5T <sub>1</sub> )
12	8.0 mg / ml (2T <sub>1</sub> )	2.5 mg / ml (3T <sub>1</sub> )	2.5 mg / ml (3T <sub>1</sub> )
13	3.8 mg / ml (2.5T <sub>1</sub> )	1.9 mg / ml (3.5T <sub>1</sub> )	3.8 mg / ml (2.5T <sub>1</sub> )

表4において、2, 6-ジメトキシフェノールが、初発濃度2μl / ml であったことにも一部起因して、実際上インフルエンザウイルス抑制効果がないことを除いて、その他のすべての検体は有用な抑制効果を達成している。ここでも特に注目されるのが、リグノスルホン酸ナトリウム塩(検体5)と同アセテート(検体6)である。すなわち、ナトリウム塩(検体5)はH3N2インフルエンザに対し100倍希釈のきわめて低い濃度まで増殖を100%抑制し、悪くともB型に対し16倍希釈(No.5試験管)の低濃度で100%抑制を達成している。ナトリウム塩アセテート(検体6)の7T<sub>0</sub>(H1N1とH3N2に対し)も驚異の成果であり、悪くともB型に対し4.5T<sub>0</sub>(10倍希釈)である。その他、グアヤコール(検体1)、リグニンスルホン酸(検体2)、3, 5-ジメトキシフェノール(検体4)、リグニンオルガノソルブプロピオネット(検体11)、4-ベンジルオキシグアヤシルグリセロール-β-グアヤシルエーテル(検体12)、シリングアルデヒド(検体13)も有効な抗インフルエンザ剤(食品・飲料)としての有用性を示唆する結果が得られている。

統いて、同じインフルエンザウイルスに対する別の抑制評価試験について説明する。対象インフルエンザウイルスは前と同じ(1)H1N1、(2)H3N2、(3)B型であり、検体はリグニンスルホン酸ナトリウム塩(検体5)、及び同アセテート(検体6)である。前の試験と異なる点は検体原液の初発濃度を2mg/ml(2倍)としたことである。この原液濃度においても、驚異的に、細胞障害は起きなかったのである(ゼロ)。結果(MIC)を表5に示す。

表5：インフルエンザウイルス抑制評価 (MIC) (2) (高濃度)

検体	インフルエンザウイルス		
	H1N1	H3N2	B
5	83.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (24倍希釈)	10.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (192倍希釈)	666.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (3倍希釈)
6	83.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (24倍希釈)	125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (16倍希釈)	666.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (3倍希釈)

原液濃度を前より上げても、なお細胞障害が起きなかつたところが注目される。表5の試験で、24倍希釈とは、2倍段階希釈で32倍希釈したNo.6試験管では効力がなかつたが、No.5(16倍)まで戻らなくとも、それより低濃度の24倍希釈で効果があつたということで、略記法では5~6T<sub>0</sub>と表わされ得る。同様に、192倍希釈は、256倍のNo.9試験管では効果がなかつたが、No.8(128倍)まで戻らなくとも中間で効力があつたということで、8~9T<sub>0</sub>と表わされ、3倍希釈はNo.3(4倍希釈)では効果ないが、No.2(2倍)との中間で効果があつたということで、2~3T<sub>0</sub>と表わされ得る。こうして、前の表4における検体5と6の抗インフルエンザウイルス性における優秀性がさらに裏付けられたのである。

#### [抗菌性試験]

次に、本発明の化学物質のうち、グアヤコール(検体1)、リグニンスルホン酸(検体2)、2,6-ジメトキシフェノール(検体3)、3,5-ジメトキシフェノール(検体4)の4種について、次の方法で抗菌性を評価する試験を行つた(他の検体5,6,11~14については後記する)。

#### A. 試験方法

感受性ディスク用培地に各検体を10%量添加して寒天平板を作成する。この平板の上に下記の表6に示す6種の菌株の試験菌液( $10^6$ 個/mlに調製)を25mlずつ接種し、37℃で48時間培養した後、各細菌の発育の有無を確認する。結果を次の表6に示す。表中、(-)は細菌発育せず、(+)は細菌発育ありを示す。

表6：抗菌性試験結果 (1)

菌株	菌数 (個/ml)	検体 1	検体2	検体 3	検体4
大腸菌O157 (E. coli O157)	2. $4 \times 10^6$	(-)	(-)	(-)	(-)
肺炎桿菌 (K. pneumoniae)	3. $1 \times 10^6$	(-)	(-)	(-)	(-)
腸炎菌 (S. Enteritidis)	1. $9 \times 10^6$	(-)	(-)	(-)	(-)
綠膿菌 (P. aeruginosa)	4. $2 \times 10^6$	(-)	(-)	(-)	(-)

黄色ブドウ球菌 ( <i>S. aureus</i> )	2. $7 \times 10^6$	(-)	(-)	(-)	(-)
枯草菌 ( <i>B. subtilis</i> )	6. $1 \times 10^5$	(-)	(-)	(-)	(-)

この表 6 から、グアヤコール（検体 1）、リグニンスルホン酸（検体 2）、2, 6-ジメトキシフェノール（検体 3）、及び 3, 5-ジメトキシフェノール（検体 4）はすべての試験菌株に對し発有抑制効果を有することが認められる。また前記したグアヤック脂も同様の抗菌性試験においてグアヤコールとほぼ同等乃至やや良好な細菌発育阻止効果を示した。

次に、残りの検体すなわちリグノスルホン酸ナトリウム塩（検体 5）、リグノスルホン酸ナトリウム塩アセテート（検体 6）、リグニンオルガノソルブロピオネート（検体 11）、4-ベンジルオキシグアヤシルグリセロール- $\beta$ -グアヤシルエーテル（検体 12）、シリングアルデヒド（検体 13）については、前記とは異なる試験方法で、同じ 6 種の細菌について抑制効果を評価した。

#### B. 試験方法

各検体（粉末）の 8% 水溶液を調製し、これを 40 倍に希釈したものを MIC 測定用検体原液として段階希釈（40 倍～400 倍）し、原液と希釈液を寒天培地上に接種した 6 種の試験菌に接種し、30°C で 17 時間培養した後、寒天培地における発育阻止帯を観察し、判定した。この結果を次の表 7 に示す。なお、原液は 8% 水溶液の 25 ml を蒸留水 1000cc で希釈して 40 倍としたもので、固形分換算で 2 mg / ml である。

表 7：抗菌性試験結果（2）

菌株	検体 5	検体 6	検体 11	検体 12	検体 13	検体 14
大腸菌 O157 ( <i>E. coli O157</i> )	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍
肺炎桿菌 ( <i>K. pneumoniae</i> )	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍
腸炎菌 ( <i>S. Enteritidis</i> )	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍
綠膿菌 ( <i>P. aeruginosa</i> )	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍
黄色ブドウ球菌 ( <i>S. aureus</i> )	<40倍	<40倍	40倍	<40倍	<40倍	<40倍
枯草菌 ( <i>B. subtilis</i> )	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍	<40倍

この表 7において、<40 倍とは 40 倍希釈では完全には発育阻止していず、40 倍以下の濃度（例えば 30 倍=3 mg / ml , 又は 20 倍=4 mg / ml ）とすべきことを示している。40 倍希釈（2 mg / ml ）で完全に発育阻止している例はリグニンオルガノソルブ（検体 11）の黄色ブドウ球菌に対してである。しかし、その他の<40 倍（40 倍以下）の例も部分的には阻止が認められ、濃度を上げれば完全阻止は十分に実現されることが見込まれている。その意味で、上記検体 5, 6, 11 ~14 はすべて十分有用な抗菌性を有すると判定される。

#### 【実施例】

現実的に数ある抗微生物剤のからリグニンスルホン酸ナトリウム及びリグニンスルホン酸ナトリウムアセテートにおける 2001 年にインフルエンザ症状にかかった人間へ服用した時の効果を述べる。

#### A. 51 歳男性、2000 年 3 月連日

3 ヶ月間の深夜におよぶ仕事で疲れており、低温・低温度の部屋で仮眠している最中にインフルエンザにかかった。最初は軽かった咳も次第に激しくなり、30 分間に 60 回もする様になり、寝汗もかいた。サウナに入っても、背中が寒い感じがする。咳き込みが激しいので、リグニンスルホン酸ナトリウムアセテート 1 g を 200cc の湯（ぬるま湯）に溶かして服用した。すると、服用直後より咳き込みも軽くなり、30 分間に 10 回程度と激減した。同様に一日 4 回を目処・目途に服用していると、喉や咳き込みによる肺付近の痛みも減少した。通常では、7 日間は仕事に復帰できないところ、その後仕事を 2 日中断した位で、仕事をしながら元気になり、回復した。軽い咳は、回復後も少し続いた。体力は維持されていた。リグニンスルホン酸ナトリウムアセテートは、ウイルスによる体力の消耗を予防し、食欲不振に陥らないようにいながら咳を減少させるなど、インフルエンザウイルスに対して治療回復力を示した。副作用は全くなかった。

#### B. 54 歳女性

例年必ずインフルエンザウイルスに数回かかるタイプである。気管支が特に弱く、かかると低血圧気味となり、食欲不振を伴い、7 日~10 日間は脱力してトイレにも這って用を足すタイプである。2001 年 3 月、仕事中にインフルエンザウイルスの初期症状が現れ、喉に違和感を覚え、咳をし出した。例年は、この状態になると 1 ~2 日後にはひどくなり、低血圧で倒れるタイプで、病院に行き点滴後 10 日間は絶対安静に寝ていなければならぬパターンを繰り返すのである。そこで、リグニンスルホン酸ナトリウム 1 g を 200cc の湯に溶かしうがいをした。すると、喉の違和感もなくなり、うがい直後より声の出も正常化した。副作用は全くなく、インフルエンザウイルスの症状の進行は止まった。例年インフルエンザウイルスに対して極弱の人にも、本発明品リグニンスルホン酸ナトリウムは有効であった。

#### 【発明の効果】

以上、本発明により確認された抗ウイルス性・抗菌性ある化学物質は、開示した試験例ではすべて単独で用いられているが、前に 3, 5-ジメトキシフェノールについて他剤との併用

について述べたように、検体1～13を1種だけで用いるだけでなく、2種又はそれ以上を混用又は併用してもよく、さらには必要に応じて1種又はそれ以上を本発明品以外の物質と混用併用することもできる。それによって、各物質が本来もっている抗ウイルス性・抗菌性の効力は減殺されることなく、むしろ増強されたり、細胞障害を低減させたりする効果がある。

本発明に係る抗ウイルス性、抗菌性に優れた諸物質は、抗ウイルス剤或いは抗菌剤、又は広く抗微生物剤という薬剤の形として、又は多面的効能を有する健康食品、健康飲料などの形でも実施することができる、経口服用（摂取）する場合の安全性は、例えばリグノスルホン酸ナトリウム塩（検体5）や同アセテート（6）のように細胞レベルの試験で障害ゼロが確認されたものは当然に安全であるといえる（これらのメーカーも無毒性を表明している）が、細胞障害が比較的強いと示された物質、例えば2,6-ジメトキシフェノールについても従来の知見から安全性あるものとして扱うことができる。従来公知の技術文献によれば、2,6-ジメトキシフェノールは、グアヤコール、シリングアルデヒドなどと共に、マウスの腹腔内及び経口投与におけるLD<sub>50</sub>値が1,000mg/kgより大きく安全性に優れていると記載されている。また、グアヤコールを人間が内服又は外用に供する時、常用量は1回0.2g、1日0.6gであることが文献に記載されているし、毒性データとしてヒトに関しORL-HMNは43mg/kgということも定められている。こうして、今日の技術水準上の知見では、本発明に係るすべての物質の安全性に問題はないといつうことができる。

これまで詳述してきたように、本発明は工業的に生産される多数の化学物質について、広範に候補を選び、それらについて抗ウイルス性（エイズ及びインフルエンザ）並びに抗菌性を多面的に評価し確認したもので、その中から選抜された本発明開示の13種の化学物質は、ウイルスや細菌という特定個別の目標に対し従来予想されていなかった優れた効力を発揮するだけでなく、抗ウイルス性から抗菌性までを含めて多面的に効力を発揮する多面的な抗微生物剤として新規な地位を確立したものである。これにより、比較的安価に、かつ安定・継続して有効な抗微生物剤を社会に提供し、さらにはこれを食品や飲料に添加混合して日常的に服用することにより、人類の健康・福祉に対し多大な貢献をなしうる実際上の効果が達成される。

**【請求の範囲】**

【請求項 1】 グアヤコール, リグニンスルホン酸, 2, 6-ジメトキシフェノール, 3, 5-ジメトキシフェノール, リグノスルホン酸ナトリウム塩, リグノスルホン酸ナトリウム塩アセテート, リグニンオルガノソルブプロピオネート, 4-ベンジルオキシグアヤシルグリセロール- $\beta$ -グアヤシルエーテル及びシリンガアルデヒドの中から選ばれた抗微生物活性を有する 1 種又はそれ以上の有効成分から成ることを特徴とする抗微生物剤.

【請求項 2】 前記有効成分が, グアヤコール, リグニンスルホン酸, 2, 6-ジメトキシフェノール, 3, 5-ジメトキシフェノール, リグノスルホン酸ナトリウム塩, リグノスルホン酸ナトリウム塩アセテート, リグニンオルガノソルブプロピオネート, 4-ベンジルオキシグアヤシルグリセロール- $\beta$ -グアヤシルエーテル及びシリンガアルデヒドの中から選ばれた 1 種のものであって, 抗微生物活性が抗ウイルス活性及び抗菌活性である請求項 1 に記載の抗微生物剤.

【請求項 3】 前記有効成分が, グアヤコール, リグニンスルホン酸, 2, 6-ジメトキシフェノール, 3, 5-ジメトキシフェノール, リグノスルホン酸ナトリウム塩, リグノスルホン酸ナトリウム塩アセテート, リグニンオルガノソルブプロピオネート, 4-ベンジルオキシグアヤシルグリセロール- $\beta$ -グアヤシルエーテル及びシリンガアルデヒドの中から選ばれた 2 種又はそれ以上のものであって, 抗微生物活性が抗ウイルス活性及び抗菌活性である諸求項 1 に記載の抗微生物剤.

【請求項 4】 前記抗ウイルス活性が, 抗エイズウイルス活性と抗インフルエンザ活性であり, 前記抗菌活性が, 大腸菌 O-157, 肺炎桿菌, 腸炎菌, 緑膿菌, 黄色ブドウ球菌, 及び枯草菌に対する抗菌活性である請求項 2 又は 3 に記載の抗微生物剤.

【請求項 5】 前記有効成分が, リグノスルホン酸ナトリウム塩又はリグノスルホン酸ナトリウム塩アセテートであって, 特に抗エイズウイルス活性が顕著である請求項 2 に記載の抗微生物剤.

【請求項 6】 前記有効成分が, リグニンオルガノソルブプロピオネートであって, 抗菌活性において優れている請求項 2 に記載の抗微生物剤.

【請求項 7】 前記有効成分がシリンガアルデヒドであって, 抗微生物活性が, 特に抗エイズウイルス活性及び抗インフルエンザウイルス活性である請求項 2 に記載の抗微生物剤.

【請求項 8】 前記有効成分がグアヤコールを含んでいるグアヤック脂であって, 抗微生物活性が抗ウイルス活性である請求項 2 に記載の抗微生物剤.

【書類名】 要約書

## 【要約】

〔目的〕比較的安定的かつ継続的に供給することができて、副作用が少なく、望ましい抗微生物活性を挙げる工業製品の化学物質の有効性を確定して抗微生物剤とすること。

〔構成〕 グアヤコール、リグニンスルホン酸、2、6-ジメトキシフェノール、3、5-ジメトキシフェノール、リグノスルホン酸ナトリウム塩、リグノスルホン酸ナトリウム塩アセテート、リグニンオルガノソルブプロピオネート、4-ベンジルオキシグアヤシルグリセロール- $\beta$ -グアヤシルエーテル及びシリンガアルデヒドの中から選ばれた抗微生物活性を有する1種又はそれ以上の有効成分から成る抗微生物剤。

〔作用効果〕 天然物と異なり、量的・質的に安定した、工業製品から成る抗微生物剤であるから、安価・安全に抗ウイルス性・抗菌性を達成することができる。